©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

(Aus dem Institut für Zoologie der Universität Wien)

# Zur Temperaturabhängigkeit des Mitochondrienstoffwechsels bei Helix pomatia und Helix aspersa (Gastropoda, Pulmonata)

Von ELISABETH JUST

Mit 8 Abbildungen und 2 Tabellen

(Vorgelegt in der Sitzung der mathem.-naturw. Klasse am 5. März 1981 durch das w. M. W. KÜHNELT)

## Einleitung

Temperaturanpassungen auf subzellulärem Niveau wurden bisher vor allem an Fischen untersucht (KANUGO u. PROSSER 1959, CALDWELL 1969, SMITH 1973, WODTKE 1974, IRVING u. WATSON 1976, PYE et al. 1976). Bei Schnecken wurden derartige Untersuchungen bisher nur von NEWELL u. PYE 1971a, 1971b durchgeführt, die die Temperaturabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs der Mitochondrien von *Littorina littorea* auch bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen haben. Dabei hat sich herausgestellt, daß der Sauerstoffverbrauch der Schneckenmitochondrien bei physiologischen Substratkonzentrationen eine andere Temperaturabhängigkeit zeigt als bei Substratsättigung. *Littorina littorea* lebt in der Gezeitenzone und ist zweimal täglich Temperaturschwankungen ausgesetzt. Es erschien nun interessant, zu untersuchen, welche Temperaturabhängigkeit der Mitochondrienstoffwechsel von Schnecken mit anderen ökologischen Ansprüchen zeigt.

Bei *Helix pomatia* und *Helix aspersa* wurden temperaturbedingte Adaptationen des Stoffwechsels bereits auf verschiedenen Organisationsniveaus nachgewiesen (BLAŽKA 1955, RIDDLE 1977 für den Gesamtmetabolismus, KRATOCHWIL 1976 für den Sauerstoffverbrauch und die Herzschlagrate, KERKUT u. LAVERACK 1957, NOPP u. FARAHAT 1967 an Gewebeschnitten, KIRBERGER 1953, MEWS 1957 an einigen Enzymen). Nach NOPP 1971a gibt es bei Heliciden hormonelle Regulationen des Sauerstoffverbrauchs.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

*Helix pomatia* und *Helix aspersa* sind zwei nahe verwandte Arten, die aber ein verschiedenes Verbreitungsgebiet und verschiedene ökologische Ansprüche haben. Die mesophile *Helix pomatia* kommt in Mitteleuropa und in England vor und ist an die Überdauerung einer längeren Kälteperiode morphologisch (durch Bildung eines Kalkdeckels) und ethologisch (durch Eingraben in den Boden) angepaßt. Die xerophile *Helix aspersa* kommt in den Mittelmeerländern vor, hält keine Winterruhe, die mit der von *Helix pomatia* vergleichbar wäre, und kann hingegen in der warmen Jahreszeit Monate (unter Umständen Jahre) im Trockenschlaf zubringen. Daher erschien es interessant, bei diesen beiden Arten die Temperaturadaptation auf subzellulärem Niveau unter Ausschluß direkter nervöser und hormoneller Einflüsse zu untersuchen.

Herrn Doz. Dr. Herbert NOPP vom Institut für Zoologie der Universität Wien danke ich für die Stellung dieses Dissertationsthemas, für seine Hilfe bei der Beschaffung der Schnecken und für die stete Förderung und das Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

## Material und Methode

Tiere: Adulte *Helix pomatia* wurden in verschiedenen Gegenden Österreichs gesammelt bzw. von Dr. O. NAVRATIL, Schneckenfarm „Omaheli", Sieghartskirchen, bezogen. Die *Helix aspersa* stammten aus der Umgebung von Rom. Die Tiere wurden im Sommer im Freien in großen Holzkisten gehalten, in denen sich eine 20 cm hohe Erdschicht und trockenes Laub und während der Vegetationsperiode verschiedene Ruderalpflanzen befanden. An den Wänden der Kiste, in der die *Helix aspersa* untergebracht waren, war eine lockere Kalksteinmauer aufgeschichtet, in die sich die Tiere meist zurückzogen. Die Fütterung erfolgte nach Bedarf.

Adaptation: Bis Mitte November hatten die *Helix pomatia* einen Winterdeckel ausgebildet. Sie wurden ausgegraben, und ein Teil der Schnecken kam in einen Kühlschrank, worin die Temperatur −1° bis +3° und die relative Luftfeuchtigkeit 41 % bis 44 % betrug. Diese Tiere werden in folgenden als 0°-Schnecken bezeichnet. Der andere Teil (im folgenden 10°-Schnecken) kam in einen Kühlraum, der eine Temperaturschwankung von +7° bis +12°, eine relative Luftfeuchtigkeit von 62 % bis 66 % und eine Lichtperiode von 8 h Helligkeit pro Tag aufwies. Nach drei Wochen Adaptationszeit wurde mit den Messungen begonnen.

Für Versuche mit trockenschlafenden Schnecken wurden die *Helix pomatia* in Klimaschränken an 10° und an 20° zwei bis drei Wochen und die *Helix aspersa* an 10°, 20° und 35° drei bis vier Wochen lang adaptiert. Der 10°-Klimaschrank wies eine relative Luftfeuchtigkeit von 62 % bis

68 % und eine tägliche Lichtperiode von 8 h Helligkeit auf, in den 20°- und 35°-Klimaschränken herrschte Dauerdunkel und eine relative Luftfeuchtigkeit von 38 % bis 44 %.

Gewinnung der Mitochondriensuspension: Den Schnecken wurde die Schale von der Mündung her weggebrochen und die Mitteldarmdrüse entnommen, der übrige Weichkörper kam sofort in 75%igen Alkohol. Von den Mitteldarmdrüsenstücken wurden anhaftende Kalksplitter und Gewebereste sorgfältig entfernt, dann kamen die Gewebestücke in ein mit 15 ml eisgekühltem Homogenisiermedium gefülltes Homogenisiergefäß. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 0 ° bis 2° C. Das Homogenisiermedium enthielt: 143 mM Saccharose, 18,6 mM Tris-HCl (pH 7,8), 2,3 mM EDTA und 0,5 % BSA (Bovine Serum Albumine), pH 7,7 bis 7,8 bei 4°. Pro Versuchstag wurden für eine Mitochondriensuspension Mitteldarmdrüsengewebe von 5 *Helix pomatia* oder 9 *Helix aspersa* verwendet.

Die Homogenisierung erfolgte mit einem Potter-S-Homogenisator der Fa. Braun, Melsungen, mit vorgekühltem Glasstempel durch dreimaliges Auf- und Abbewegen des Stempels bei 600 Upm. Der Glasstempel war mit Quarzsand etwas abgeschliffen worden, da Schneckenmitochondrien beim Homogenisieren leicht zerstört werden können. Das so gewonnene Homogenat wurde anschließend 15 min lang bei 600 g zentrifugiert, der Überstand durch drei Lagen Mullbinde dekantiert und dieser nochmals 15 min bei 11.000 g zentrifugiert. Danach sind im Rückstand die Mitochondrien angereichert (JOHNSON u. LARDY 1967, NEWELL u. PYE 1971b, SMITH 1973, eigene Untersuchungen). Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt befanden sich Lipide an der Oberfläche des Überstandes und an der Wand des Zentrifugenröhrchens, die sorgfältig entfernt wurden.

Der Rückstand wurde mit 1,5 ml Meßmedium in ein vorgekühltes Homogenisiergefäß übergeführt und von Hand aus resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde für die Dauer der Versuche (3 bis 4 h) in einem Eisbad aufbewahrt. Das Meßmedium enthielt: 143 mM Saccharose, 5,7 mM KCl, 2,8 mM $MgCl_2$, 5,7 mM $KH_2PO_4$, pH 7,7–7,8 bei Meßtemperatur. Die so erhaltene Mitochondriensuspension hatte einen Proteingehalt von durchschnittlich 20 mg/ml. Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Folin-Phenol-Methode nach LOWRY et al. 1951 mit einem Beckmann-Spektralphotometer Modell B bei 750 nm. Als Standard diente BSA.

Polarographische Sauerstoffmessung: Die Messung des Sauerstoffverbrauches der Mitochondriensuspension erfolgte mit Hilfe einer Clark-Elektrode, Yellow-Springs M 53. Die Meßküvetten waren in eine thermostatisierte Flüssigkeit eingespannt und wurden mit

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

2 ml Meßmedium beschickt. Das Meßgerät der Sauerstoffsonde war mit einem Schreibgerät der Fa. Bausch & Lomb verbunden.

Der Sauerstoffgehalt in der Meßkammer bei verschiedenen Temperaturen wurde aus der Tabelle von MURRAY u. RILEY 1969 errechnet. Mit der Sauerstoffsonde wurde verglichen, ob meßbare Unterschiede im $O_2$-Gehalt für 2 ml Aquadest und 2 ml Meßmedium bestehen. Da diese Unterschiede bei allen Temperaturen unter 1 % lagen, wurden die Tabellenwerte für Aquadest zur Berechnung herangezogen.

Testsubstrate: Für die Messung des Sauerstoffverbrauchs der Mitochondriensuspension wurde Succinat in Endkonzentrationen von 0,02 mM bis 10 mM verwendet. Zur Untersuchung des P:O-Verhältnisses und des RCR (Respirationskontrolle) wurden 5 µl einer 0,1-mM-ADP-Lösung in das Reaktionsgefäß eingebracht. P:O-Verhältnis und RCR sind Maße für die oxidative Phosphorylierung von Mitochondrienpräparaten bei Zusatz definierter ADP-Mengen und zugleich Maße für die Intaktheit der untersuchten Mitochondrien. ADP stammte von der Fa. Boehringer, Mannheim, alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck bezogen.

Auswertung: Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondriensuspension, das P:O-Verhältnis und der RCR-Wert wurden nach ESTABROOK 1967 errechnet. Zur Absicherung der Werte in Abb. 3 wurde der t-Test ($p \leqq 0{,}05$, bezogen auf die Anzahl der Messungen) verwendet.

## Ergebnisse

### 1. P:O-Verhältnis und RCR-Werte

Bei den Mitochondrienpräparaten aus der Mitteldarmdrüse von *Helix pomatia* und *Helix aspersa* war sowohl bei winterschlafenden als auch bei trockenschlafenden Schnecken eine oxidative Phosphorylierung feststellbar. Ein P:O-Verhältnis konnte nur bei höheren Temperaturen (ab 20°) und bei Substratsättigung (10 mM Succinat) berechnet werden.

Die in Tabelle 1 dargestellten P:O-Werte sind etwas höher als die mit Fischmitochondrien erhaltenen Werte (0,96 bis 1,61 aus Aalleber, WODTKE 1974; 0,93 bis 1,14 aus der Leber der Schleie, PYE et al. 1976) und weisen eine sehr geringe Standardabweichung auf. Allerdings konnte nicht bei jeder Messung ein State III festgestellt werden.

RCR-Werte konnten hingegen auch für verschiedene Temperaturen und Succinatkonzentrationen berechnet werden. Die Ergebnisse dieser Versuche, die mit winterschlafenden (an 0° und an 10° adaptierten) und trockenschlafenden (an 20° adaptierten) *Helix pomatia* bei verschiedenen

Tabelle 1: P:O-Verhältnis isolierter Helix-Mitochondrien; 10 mM Succinat, Zusatz von 500 nMol ADP

| | Meßtemperatur | P:O | |
|---|---|---|---|
| *Helix pomatia* trockenschlafend | 25° | 1,45 ± 0,07 | n = 12 |
| *Helix pomatia* winterschlafend | 20° | 1,63 ± 0,02 | n = 4 |
| *Helix aspersa* trockenschlafend | 25° | 1,64 ± 0,07 | n = 5 |

Meßtemperaturen und Succinatkonzentrationen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 2 einerseits nach der Succinatkonzentration, andererseits nach der Meß- bzw. Adaptationstemperatur aufgeschlüsselt.

Tabelle 2: Respirationskontrolle von Helix-Mitochondrien

| mM Succinat | RCR | |
|---|---|---|
| 10 | 1,2 ± 0,12 | n = 20 |
| 5 | 1,22 ± 0,1 | n = 24 |
| 2 | 1,12 ± 0,04 | n = 7 |
| 1 | 1,17 ± 0,08 | n = 5 |
| 0,5 | 1,35 ± 0,07 | n = 2 |
| Meßtemperatur | | |
| 30° | 1,16 ± 0,05 | n = 3 |
| 25° | 1,21 ± 0,13 | n = 19 |
| 20° | 1,2 ± 0,12 | n = 22 |
| 15° | 1,2 ± 0,07 | n = 9 |
| 10° | 1,26 ± 0,11 | n = 4 |
| 5° | 1,3 | n = 1 |
| Adaptations-temperatur | | |
| 20° | 1,26 ± 0,08 | n = 9 |
| 10° | 1,19 ± 0,1 | n = 35 |
| 0° | 1,2 ± 0,1 | n = 14 |

Aus Tabelle 2 kann man sehen, daß der RCR-Wert der Mitochondrien unabhängig von der Adaptationstemperatur, der Meßtemperatur und im Bereich von 0,5 bis 10 mM Succinat auch unabhängig von der Substratkonzentration ist. Bei Konzentrationen von 0,1 mM Succinat und darunter konnte kein RCR-Wert mehr festgestellt werden.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

## 2. Temperaturversuche mit winterschlafenden Helix pomatia

### a) Versuche mit 0°- und 10°-Schnecken

Die Sauerstoffverbrauchsmessungen an winterschlafenden Weinbergschnecken fanden in den Monaten Dezember bis März statt (Abb. 1). In der Zeit von Dezember bis Anfang März blieb der Sauerstoffverbrauch der 0°-Schnecken bei derselben Meßtemperatur und Succinatkonzentration gleich, aber im März begannen die Meßergebnisse von den vorher gewonnenen deutlich abzuweichen (siehe Kapitel 2c). Bei den 10°-Schnecken lagen hingegen die im März gewonnenen Meßwerte innerhalb der Standardabweichungen der in den vorhergehenden Monaten erhaltenen Ergebnisse und wurden deshalb in die Berechnung miteinbezogen.

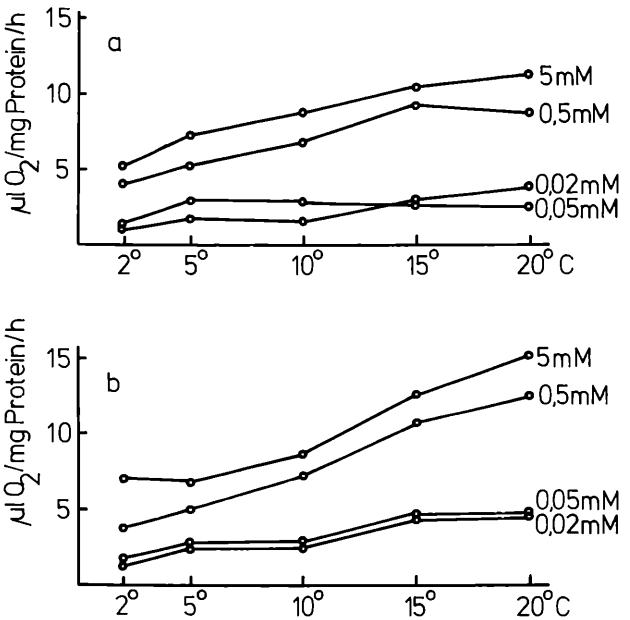


*Abb. 1:* Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von *Helix pomatia*, winterschlafend
a) an 0° adaptiert
b) an 10° adaptiert

Man sieht aus der Abbildung 1, daß sich die Temperaturverlaufskurven von Weinbergschnecken, die ihren Winterschlaf bei 0° verbrachten, von solchen, die ihn bei 10° verbrachten, im Bereich der höheren Substratkonzentrationen deutlich unterscheiden. Ab 10° Meßtemperatur

nimmt die Steilheit der Kurven, die mit 0,5 mM bzw. 5 mM Succinat erhalten wurden, bei den 0°-Schnecken ab und bei den 10°-Schnecken zu. Die Mitochondrien der 10°-Schnecken verbrauchen bei höheren Temperaturen und höheren Konzentrationen etwa 30 % mehr Sauerstoff als die der 0°-Schnecken. Der Kurvenverlauf bei der physiologischen Konzentration 0,02 mM ist in beiden Adaptationsgruppen sehr ähnlich. Die 0,05 mM-Succinat-Kurve verläuft bei den 10°-Schnecken parallel zur Kurve mit 0,02 mM, während die 0,05-mM-Kurve der 0°-Schnecken eine fallende Tendenz zeigt, entsprechend den Kurven der höheren Konzentrationen.

b) Kurzzeitadaptierung

Da sich bei den Weinbergschnecken, die ihren Winterschlaf bei 0° bzw. 10° verbrachten, deutliche Unterschiede in der Succinatatmung ihrer Mitochondrien zeigten, erschien es interessant, zu untersuchen, wie die Temperaturkurven aussehen, wenn man 0°-Schnecken kurze Zeit bei 10° hält und umgekehrt 10°-Schnecken kurzfristig an 0° adaptiert.

Zu diesem Zweck wurden zehn 0°-Schnecken auf 10° gebracht und fünf davon nach 16 h und die nächsten fünf nach drei Tagen untersucht. Ebenso wurden zehn Schnecken von 10° auf 0° transferiert und deren Mitochondrienatmung ebenfalls nach 16 h bzw. drei Tagen gemessen (Abb. 2). Zur Absicherung der Ergebnisse wurden diese Versuche in der darauffolgenden Woche wiederholt. Die Messungen erfolgten im Februar 1978, danach wurden die Versuche, die in Kapitel 2a beschrieben sind, fortgesetzt. Der erhöhte Sauerstoffverbrauch der 0°-Schnecken, der in Kapitel 2c beschrieben wird, trat erst eine Woche später auf.

Aus der Abbildung 2a und 2c ersieht man, daß sich der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien der Schnecken, die 16 h lang an die neue Temperatur adaptiert wurden, gegenüber den Ausgangswerten sowohl bei den 0°- wie bei den 10°-Schnecken zunächst erhöht. Das deutet darauf hin, daß die veränderte Umgebungstemperatur von den Schnecken registriert wurde und es zu einer leichten Aktivierung des Mitochondrienstoffwechsels gekommen ist. Bei den 0°-Schnecken, die nun bei 10° gehalten werden, erhöht sich der Sauerstoffverbrauch noch weiterhin. Die Form der Kurve in Abb. 2b nähert sich bereits der der 10°-Schnecken.

Bei den 10°-Schnecken, die nun bei 0° gehalten werden, sind nach drei Tagen die Meßwerte für den Sauerstoffverbrauch bereits abgesunken. Die Kurve wird flacher und nähert sich den Werten, die mit 0°-Schnecken und 0,05 mM Succinat erhalten wurden.

Vergleicht man die Kurven von 2a und 2d, so sieht man, daß sie beinahe einen identischen Verlauf zeigen. Diese Tatsache läßt vermuten,

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

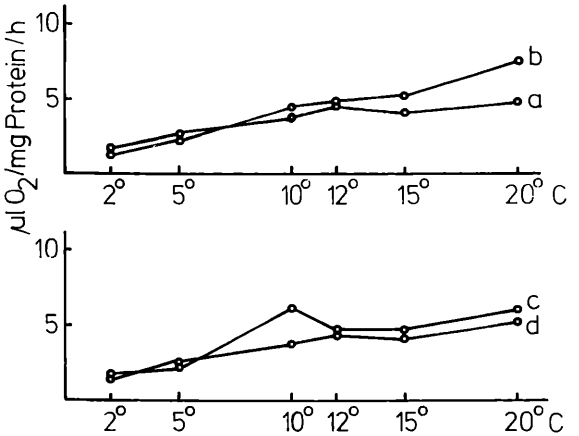


*Abb. 2:* Kurzzeitadaptierung winterschlafender *Helix pomatia;* 0,05 mM Succinat
a) 0°-Schnecken 16 h an 10° adaptiert
b) 0°-Schnecken 3 Tage an 10° adaptiert
c) 10°-Schnecken 16 h an 0° adaptiert
d) 10°-Schnecken 3 Tage an 0° adaptiert

daß sich die 0°-Schnecken nach 16 h bei 10° in demselben oder in einem sehr ähnlichen Stoffwechselzustand in bezug auf den Succinatabbau befinden, den die 10°-Schnecken nach drei Tagen Aufenthalt bei 0° erreichen. Diese Vermutung wird noch verstärkt durch die Tatsache, daß man dasselbe Phänomen, wenn auch weniger deutlich, auch bei den Kurven 2b und 2c beobachten kann. Der abweichende Kurvenpunkt in 2c befindet sich gerade bei jener Temperatur, an die die Schnecken vorher adaptiert waren. Da dieser Wert aus zwei Präparaten zu je fünf Schnecken gewonnen wurde, kann man ihn so interpretieren, daß die Schnecken gerade in Umstellungen im Stoffwechsel begriffen waren und daß diese Umstellungen aber keineswegs bei allen Schnecken synchron erfolgten.

### c) Versuche gegen Ende des Winters

Von Anfang Dezember bis Anfang März waren die erhaltenen Meßwerte für den Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien winterschlafender *Helix pomatia* etwa gleich geblieben. Ab 6. März zeigte sich aber bei den 0°-Schnecken ein viel höherer Sauerstoffverbrauch als bisher (Abb. 3), während die Messungen an den 10°-Schnecken dieselben Werte wie in den vergangenen drei Monaten ergaben. Diese Abweichungen der Meßwerte der 0°-Schnecken waren so stark, daß sie auch nach einer Überprüfung mittels t-Test außerhalb des Streuungsbereiches von 95 % lagen.

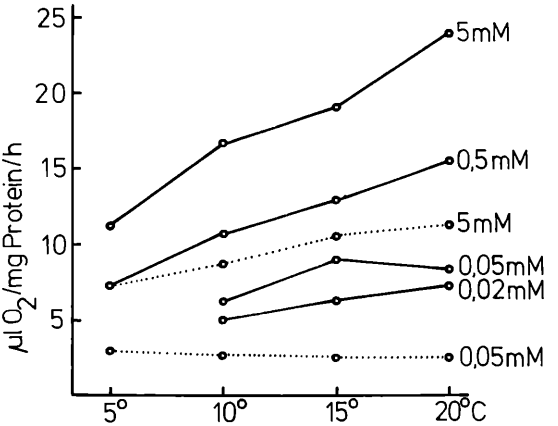


*Abb. 3:* Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von 0°-Schnecken gegen Ende des Winters ———; in den Monaten Dezember, Jänner und Februar ----------. Die Werte stammen von 20 Schnecken in der Zeit vom 6. bis 15. März 1978

Diese Schnecken hatten ihren Winterschlaf in einem Kühlschrank verbracht, dessen Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Lichtverhältnisse (bedingt durch das Öffnen und Schließen) den ganzen Winter über gleich blieben. Die Stoffwechselaktivierung dieser Schnecken kann also nicht auf eine Änderung dieser Umweltparameter zurückgeführt werden. Für die 10°-Schnecken blieben die Bedingungen in bezug auf Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Lichtperiode ebenfalls gleich.

Von der Lichtperiode her sind die beiden Schneckengruppen leider nicht vergleichbar. Aber es ist bemerkenswert, daß gerade die 0°-Schnecken, die unphysiologischen Beleuchtungsverhältnissen bei konstanter Temperatur und Feuchtigkeit ausgesetzt waren, im März ihren Mitochondrienstoffwechsel aktivierten. Die Schnecken bereiteten ihren Stoffwechsel offenbar endogen auf das Aufwachen aus dem Winterschlaf vor. Das ist zu diesem Zeitpunkt durchaus sinnvoll, da man Mitte März bei entsprechender Witterung im Freiland bereits aktive *Helix pomatia* finden kann.

## 3. Temperaturversuche mit trockenschlafenden Helix pomatia

Zum Vergleich mit den winterschlafenden 10°-Schnecken wurden trockenschlafende *Helix pomatia* zwei Wochen im Mai an 10° adaptiert und untersucht (Abb. 4).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

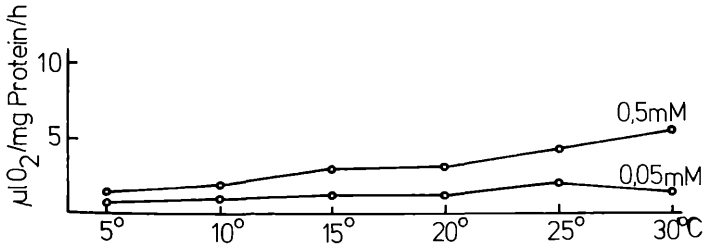


*Abb. 4:* Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von trockenschlafenden *Helix pomatia;* Adaptationstemperatur: 10°

Obwohl die winterschlafenden und trockenschlafenden *Helix pomatia* unter fast denselben Bedingungen an 10° adaptiert wurden, unterscheiden sich die erhaltenen Kurven deutlich voneinander. Der Sauerstoffverbrauch der trockenschlafenden Schnecken ist bei allen Temperaturen und Konzentrationen um die Hälfte bis zwei Drittel niedriger als der der winterschlafenden Schnecken. Die beiden Plateaus in der Temperaturkurve von 0,05 mM Succinat bei den Winterschnecken treten nicht mehr auf, statt dessen erfolgt eine geringe, aber gleichmäßige Zunahme des Sauerstoffverbrauchs von 5° bis 30°

Im Mai und Juni 1978 wurden trockenschlafende *Helix pomatia* zwei Wochen lang an 20° adaptiert und untersucht (Abb. 5).

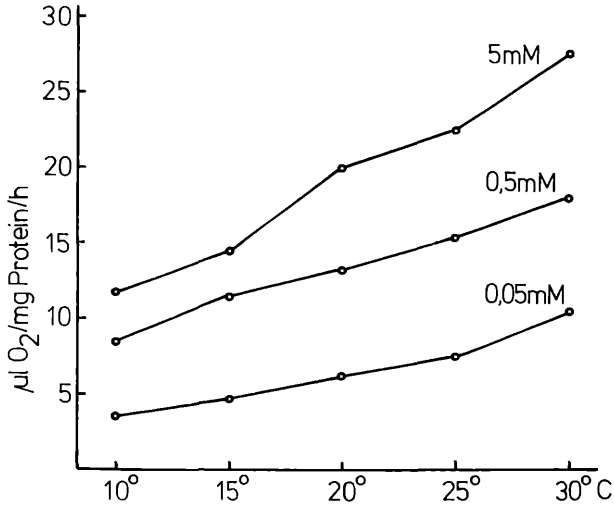


*Abb. 5:* Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von trockenschlafenden *Helix pomatia;* Adaptationstemperatur: 20°

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, sind die Respirationsraten der bei 20° trockenschlafenden *Helix pomatia* zwei- bis viermal so hoch als die entsprechenden Werte der winter- oder bei 10° trockenschlafenden Weinbergschnecken.

## 4. Temperaturversuche mit trockenschlafenden Helix aspersa

Zum Vergleich mit den bei 10° winter- bzw. trockenschlafenden *Helix pomatia* wurden trockenschlafende *Helix aspersa* drei Wochen lang an 10° adaptiert und die Succinatatmung ihrer Mitochondrien gemessen (Abb. 6). Die Adaptation und Messung erfolgte in den Monaten November und Dezember, also zu einer Jahreszeit, in der die *Helix aspersa* auch in ihrem natürlichen Lebensraum ähnlichen Temperaturen ausgesetzt sind und die sie in wochen- bis monatelangem Trockenschlaf verbringen (FRÖMMING 1954).

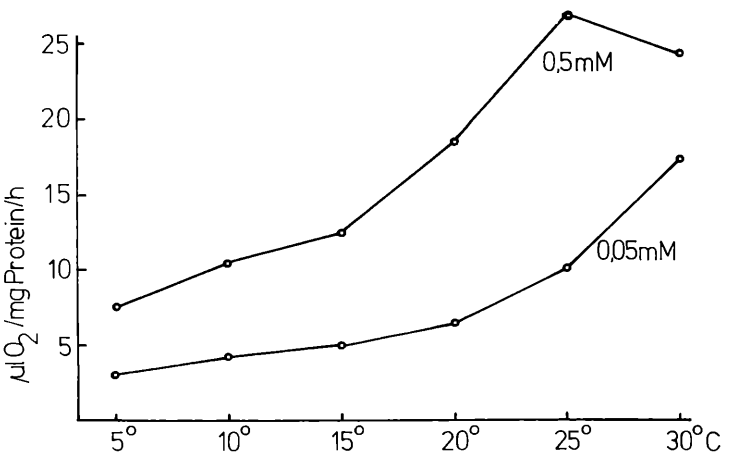


*Abb. 6:* Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von trockenschlafenden *Helix aspersa;* Adaptationstemperatur: 10°

Wie man aus diesen Ergebnissen sieht, erreichen die 10°-*Helix aspersa* bei allen Meßtemperaturen und Konzentrationen viel höhere Sauerstoffverbrauchswerte als die bei 10° winter- bzw. trockenschlafenden *Helix pomatia.*

Die Untersuchungen der Mitochondrienatmung von *Helix aspersa,* die drei Wochen an 20° adaptiert waren, fanden in den Monaten September und Oktober statt (Abb. 7).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

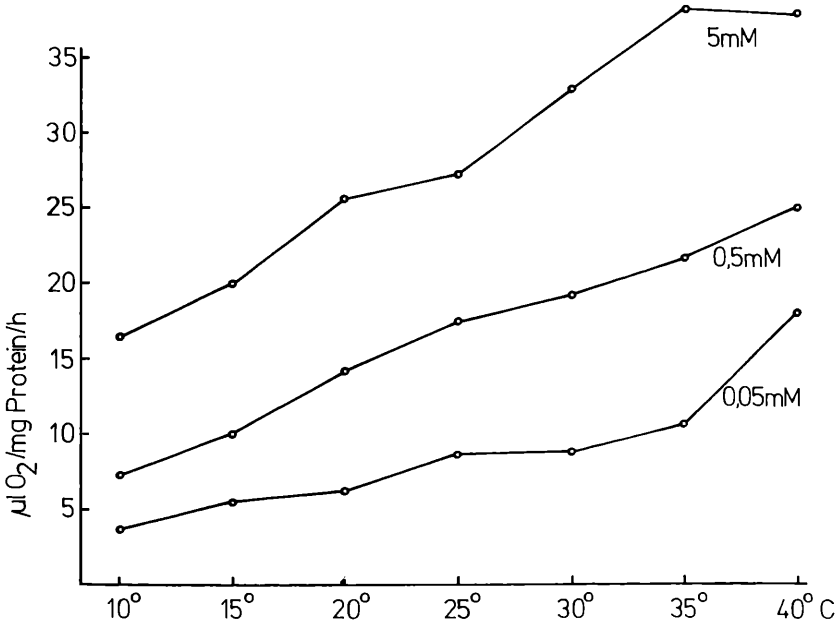


*Abb. 7:* Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von trockenschlafenden *Helix aspersa;* Adaptationstemperatur: 20°

*Helix aspersa* ist im Sommer in ihrem natürlichen Lebensraum oft wochenlang hohen Temperaturen ausgesetzt. Da eine Aktivität (außer eventuell in der Nacht) mit zu hohen Wasserverlusten verbunden wäre, verbringen die Tiere diese Zeit meist trockenschlafend. Deshalb wurden in den Monaten Juni und Juli Messungen an trockenschlafenden *Helix aspersa* durchgeführt, die drei Wochen lang an 35° adaptiert waren (Abb. 8).

An diesen Ergebnissen fällt zunächst auf, daß bei allen Temperaturen und Konzentrationen wesentlich niedrigere Respirationsraten erreicht werden als bei den entsprechenden Meßtemperaturen und Konzentrationen der bei 10° bzw. 20° trockenschlafenden *Helix aspersa.* Weiters sieht man, daß die Kurven der drei Konzentrationen sehr nahe beieinander liegen und weitgehend parallel verlaufen. Im Bereich von 10° bis 25° erfolgt bei allen Kurven ein gleichmäßiger, aber geringer Anstieg, während bei 30° bis 40° der Sauerstoffverbrauch bei allen drei Konzentrationen stark zunimmt.

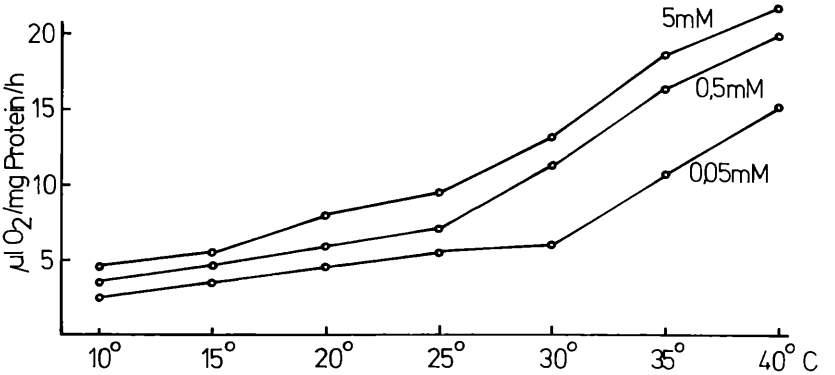


*Abb. 8:* Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von trockenschlafenden *Helix aspersa;* Adaptationstemperatur: 35°

## Diskussion

Wie man aus Tabelle 1 und 2 sieht, war bei den isolierten *Helix*-Mitochondrien eine oxidative Phosphorylierung einwandfrei feststellbar. Dieser Nachweis ist für Schneckenmitochondrien lange Zeit nicht gelungen (REES 1953, PIETRZYKOWSKI u. MICHEJDA 1969). Erst PILC u. OBUCHOWICZ 1976 konnten Mitochondrien aus der Mitteldarmdrüse von *Viviparus viviparus* isolieren, bei denen die oxidative Phosphorylierung funktionierte. Schneckenmitochondrien sind in diesem Punkt offenbar sehr empfindlich, die quantitative ADP-Umsetzung war nur bei höheren Meßtemperaturen und auch nicht bei jeder Messung nachweisbar.

Der RCR-Wert der Succinatatmung der Schneckenmitochondrien konnte hingegen auch bei niedrigeren Meßtemperaturen und Substratkonzentrationen festgestellt werden und lag im unteren Bereich der Werte, die man mit poikilothermen Wirbeltieren erhält (1,2 bei *Helix pomatia;* 1,2 bis 2,5 bei der Leber der Schleie, PYE et al. 1976; 2 bis 3 bei Aalleber, WODTKE 1974). In den Untersuchungen von PYE et al. 1976 und DAVISON 1971 (Fliegenmuskeln) war der RCR-Wert der isolierten Mitochondrien ebenfalls unabhängig von der Meßtemperatur, in der Arbeit von WODTKE 1974 unabhängig von der Adaptationstemperatur.

Nach JUST 1979 bewirkt bei *Helix*-Mitochondrien, die in der vorhin beschriebenen Weise isoliert wurden, nur der Zusatz von Succinat eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs, während der Zusatz von Malat, Fumarat, α-Ketoglutarat, Pyruvat, Citrat und Oxalacetat keine

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Atmungssteigerung bewirkt. Die Succinatdehydrogenase befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran, während die Abbauenzyme der übrigen genannten Substrate in der Matrix lokalisiert sind. Die innere Mitochondrienmembran ist impermeabel für diese Substrate, diese können nur durch spezielle Carrier in die Matrix gelangen (HELDT 1972). Die Wirkungslosigkeit dieser Substrate könnte dadurch bedingt sein, daß die entsprechenden Carrier durch die Isolierungsmethode funktionsunfähig wurden und diese Substrate gar nicht zu ihren Abbauenzymen gelangen konnten.

Der Sauerstoffverbrauch der isolierten Mitochondrien in Gegenwart von Succinat ist somit einerseits auf die Succinatdehydrogenase, andererseits auf die Enzyme der Endatmungskette zurückzuführen. Die Succinatdehydrogenase nimmt bei den Mollusken eine besondere Stellung ein. Succinatzusatz zu isolierten *Helix*-Mitochondrien bewirkt eine wesentlich stärkere Zunahme des Sauerstoffverbrauches als bei Rattenlebermitochondrien (JUST 1979). Wie in Untersuchungen zur Anaerobiose verschiedener Mollusken gezeigt werden konnte (HOCHACHKA u. SOMERO 1973, GÄDE u. ZEBE 1973, DE ZWAAN u. WIJSMAN 1976, WIDDOWS et al. 1979), wird bei der Anaerobiose in Mollusken unter anderem Succinat gebildet, welches dann in den kurzen Respirationsphasen abgebaut wird. Da man annehmen kann, daß auch Weinbergschnecken während des Winter- bzw. Trockenschlafes partiell anaerob leben (NOPP 1971b, 1974, WIESER 1978, 1980), ist es verständlich, daß sie eine effektive Succinatdehydrogenase besitzen.

Wie man aus den Ergebnissen sieht, haben während der Temperaturadaptation in den Mitochondrien Stoffwechselumstellungen stattgefunden, deren Auswirkungen auch noch nach der Isolierung meßbar sind. Neben einer direkten Einwirkung der Temperatur auf Enzyme kommen als Mechanismen für die Temperaturadaptation vor allem Isoenzyme in Frage, wie das bereits bei vielen poikilothermen Organismen (HOCHACHKA u. SOMERO 1973, SMITH et al. 1974) und auch an Schnecken (COLES 1969) nachgewiesen werden konnte. Dafür sprechen einerseits die beiden Plateaus bei den Kurven der physiologischen Konzentrationen in Abb. 1b und andererseits die Ergebnisse der Kurzzeitadaptierung (Abb. 2). So deutet die Aktivierung der Mitochondrienatmung bei den Schnecken, die 16 h lang einer neuen Umgebungstemperatur ausgesetzt waren, darauf hin, daß eine vermehrte Synthese neuer Isoenzyme stattgefunden haben könnte. Ein wesentlich stärkeres Argument ist aber die Ähnlichkeit der Kurven 2a und 2d bzw. 2b und 2c und die Annäherung der Kurven der drei Tage adaptierten Schnecken an die der voll adaptierten *Helix pomatia*.

Man kann annehmen, daß diese Temperaturanpassungen durch Konzentrationsverschiebungen der beteiligten Isoenzyme zustande kommen, wie das für viele Organismen schon nachgewiesen wurde (KANUGO u. PROSSER 1959, HOCHACHKA u. SOMERO 1973, PRECHT et al. 1973). Diese Umstellungen erfolgten von 0° auf 10° und von 10° auf 0° etwa gleich schnell. Ähnliche Ergebnisse erhielten KÜNNEMANN et al. 1970 bei Untersuchungen der Succinatatmung verschieden adaptierter Goldorfen.

Am Ende des Winters kam es bei den 0°-Schnecken zu einer drastischen Umstellung des Mitochondrienstoffwechsels, wie man aus Abb. 3 sehen kann. Die stark erhöhten Respirationsraten sind vermutlich auf eine Aktivitätszunahme der Enzyme der Endatmungskette zurückzuführen. Man kann annehmen, daß die Aktivität dieser Enzyme während des Winterschlafes stark reduziert war, daher synthetisieren oder aktivieren die Schnecken diese Enzyme des Energiestoffwechsels, um bei entsprechenden Umweltverhältnissen den Winterdeckel abwerfen und auskriechen zu können. Bei den 10°-Schnecken war eine derartige Aktivitätszunahme nicht festzustellen. Vermutlich besitzen diese Schnekken eine Enzymausstattung, die auch bei plötzlich eintretender Erwärmung eine genügend hohe Effektivität gewährleistet.

Da die 0°-Schnecken im März denselben Umweltbedingungen in bezug auf Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Lichtperiode wie in den vergangenen Monaten ausgesetzt waren, müssen an diesen Umstellungen auch endogene Faktoren beteiligt gewesen sein. Es gibt bereits eine ganze Reihe von Untersuchungen, die nachweisen, daß Beginn und Ende des Winterschlafes der Weinbergschnecken nicht nur von äußeren, sondern auch von inneren Faktoren abhängen (KIRBERGER 1953, JEPPESEN u. NYGARD 1976). MEINCKE 1975 konnte sogar feststellen, daß Weinbergschnecken auch bei konstanter Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Photoperiode sich im November in den Winterschlaf begeben und im April wieder auskriechen. Endogene Zeitgeber sind für die Schnecken offenbar wichtiger als eine Veränderung der Umgebungsbedingungen. Ein möglicher endogener Zeitgeber wären die Schwankungen im Stoffgehalt im Lauf des Jahres, die für Weinbergschnecken bereits in vielen Organen nachgewiesen sind (v. BRAND 1931, TILGNER-PETER 1957, MEINCKE 1972, MEINCKE 1975, HUNTER u. POPOVICH 1977).

Vergleicht man die Ergebnisse, die mit den verschieden adaptierten *Helix aspersa* erhalten wurden, untereinander, so sieht man, daß der Sauerstoffverbrauch der Mitochondriensuspension bei derselben Meßtemperatur umso höhere Werte ergibt, je niedriger die Adaptationstemperatur war. Das entspricht genau dem Typ 3 der Temperaturadaptatio-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

nen nach PRECHT 1961. Bei den bei 10° und 20° trockenschlafenden *Helix pomatia* war hingegen keine Temperaturkompensation feststellbar.

Neben dieser partiellen Temperaturkompensation scheint bei den an 35° adaptierten *Helix aspersa* auch noch eine allgemeine Drosselung des Mitochondrienstoffwechsels eine Rolle zu spielen, die sich auch im Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien zeigt. Der ganze Mitochondrienstoffwechsel dieser Schnecken unterliegt offenbar einer starken Kontrolle auf enzymatischem Niveau, da eine zehnfache Zunahme der Succinatkonzentration nur eine relativ geringe Zunahme der Mitochondrienatmung bewirkt. Bei 35° laufen die Stoffwechselreaktionen relativ schnell ab. Um nun den Zustand des Trockenschlafes gerade bei dieser Temperatur möglichst lange aufrechterhalten zu können, ist eine derartige Drosselung des Stoffwechsels aus Gründen der Wasser- und Reservestoffökonomie sehr von Vorteil.

Die bei 10° und 20° trockenschlafenden *Helix aspersa* hatten eine derartige Stoffwechseldrosselung offenbar nicht nötig, da die Stoffwechselreaktionen bei der jeweiligen Trockenschlaftemperatur ohnehin langsamer ablaufen als bei den an 35° adaptierten *Helix aspersa*.

Die Temperaturadaptationen auf Enzymniveau zeigen auch bei anderen Tieren eine deutliche Beziehung zum Lebensraum und sind von der systematischen Zugehörigkeit des betreffenden Tieres weitgehend unabhängig. So zeigen etwa Organismen aus verschiedenen Tierstämmen, die aber denselben Lebensraum bewohnen, oft große Ähnlichkeit in bezug auf ihre Temperaturanpassung auf Enzymniveau (HAMMEN u. LUM 1966, NEWELL 1967, MACMAHON u. RUSSELL-HUNTER 1977), während so nahe verwandte Arten wie *Helix pomatia* und *Helix aspersa* sich in diesem Punkt auf Grund ihrer verschiedenen ökologischen Ansprüche deutlich unterscheiden können.

## Zusammenfassung

1. Isolierte Mitochondrien aus der Mitteldarmdrüse von *Helix pomatia* und *Helix aspersa* haben in Gegenwart von Succinat die Fähigkeit zur oxidativen Phosphorylierung. Der RCR-Wert beträgt 1,2 und ist unabhängig von der Meßtemperatur, der Succinatkonzentration und der Adaptationstemperatur der Schnecken.

2. Die Mitochondrien der bei 0° winterschlafenden *Helix pomatia* zeigen bei allen gemessenen Temperaturen und Succinatkonzentrationen einen geringeren Sauerstoffverbrauch als die Mitochondrien der bei 10° winterschlafenden Weinbergschnecken bei derselben Meßtemperatur und Konzentration.

3. Hält man bei 0° winterschlafende *Helix pomatia* kurzfristig bei 10° bzw. 10°-Schnecken bei 0°, so stellt sich der Mitochondrienstoffwechsel innerhalb weniger Tage auf die neue Temperatur um.

4. Die Mitochondrien der bei 0° winterschlafenden *Helix pomatia* zeigen gegen Ende des Winters einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch als in den vorherigen Monaten. Bei den bei 10° winterschlafenden Weinbergschnecken hingegen liegen die Werte des Sauerstoffverbrauchs auch gegen Ende des Winters innerhalb der Standardabweichung der vorher gemessenen Werte.

5. Bei 10° trockenschlafende *Helix pomatia* haben viel niedrigere Respirationsraten der Mitochondrien als winterschlafende *Helix pomatia*. Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von bei 20° trockenschlafenden *Helix pomatia* ist hingegen wesentlich höher.

6. Adaptiert man trockenschlafende *Helix aspersa* an 10°, 20° und 35°, so zeigt ihre Mitochondrienatmung eine Temperaturkompensation vom Typ 3 nach PRECHT 1961. Die Respirationsraten der Mitochondrien von *Helix aspersa* sind bei allen Meßtemperaturen und Succinatkonzentrationen stets höher als die der *Helix pomatia*, die an dieselben Temperaturen adaptiert wurden.

7. Die möglichen Ursachen für diese Temperaturadaptationen in *Helix*-Mitochondrien und die Beziehung der Ergebnisse zum Anaerobiosestoffwechsel und zum Winterschlaf der Weinbergschnecken werden diskutiert.

## Literatur

BLAŽKA, P., 1955: Temperaturadaptationen des Gesamtmetabolismus bei der Weinbergschnecke *Helix pomatia* L. Zool. Jb. Abt. allg. Zool. u. Physiol. 65: 430–438.

BRAND, T. v., 1931: Der Jahreszyklus im Stoffbestand der Weinbergschnecke *Helix pomatia*. Z. vergl. Physiol. 14: 200–264.

CALDWELL, R. S., 1969: Thermal compensation of respiratory enzymes in tissues of the Goldfish (*Carassius auratus* L.). Comp. Biochem. Physiol. 31: 79–93.

COLES, G. C., 1969: Isoenzymes of snail livers. – I. Hydrolysing enzymes and peroxidase. Comp. Biochem. Physiol. 29: 403–411.

DAVISON, T. F., 1971: The effect of temperature on oxidative phosphorylation in isolated flight muscle sarcosomes. Comp. Biochem. Physiol. 38 B: 21–34.

DE ZWAAN, A., u. WIJSMAN, T. C. M., 1976: Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 54 B: 313–324.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ESTABROOK, R. W 1967: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. In: COLOWICK, S., u. KAPLAN, N., 1967: Methods in Enzymology X., 41–47. Acad. Press.

FRÖMMING, E., 1954: Biologie der mitteleuropäischen Landgastropoden. Duncker & Humblodt, Berlin.

GÄDE, G., u. ZEBE, E., 1973: Über den Anaerobiosestoffwechsel Molluskenmuskeln. J. Comp. Physiol. 85: 291–301.

HAMMEN, C. S., u. LUM, S. C., 1966: Fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in bivalve mollusks and brachiopodes. Comp. Biochem. Physiol. 19: 775–781.

HELDT, H. W., 1972: Energy metabolism in mitochondria. Angew. Chem. Int. Edit. Engl. 11 (9): 792–798.

HOCHACHKA, P. W., u. SOMERO, G. N., 1973: Strategies on biochemical adaptation. W. B. Saunders, Philadelphia.

HUNTER, P. D., u. POPOVICH, B. W., 1977: Seasonal changes in organic carbon and C:N ratio in the major storage organs of *Cepea nemoralis* (Mollusca, Pulmonata). Comp. Biochem. Physiol. 58 A: 198–204.

IRVING, D. O., u. WATSON, K., 1976: Mitochondrial enzymes of tropical fish: A comparison with fish from cold waters. Comp. Biochem. Physiol. 54 B: 81–92.

JEPPESEN, L. L., u. NYGÅRD, K., 1976: The influence of photoperiod, temperature and internal factors on the hibernation of *Helix pomatia* L. (Gastropoda, Pulmonata). Vidensk. Medd. dansk. naturh. Foren. 139: 7–20.

JOHNSON, D., u. LARDY, H., 1967: Isolation of liver and kidney mitochondria. In: COLOWICK, S., u. KAPLAN, N., Methods in Enzymology X: 94–96. Acad. Press.

JUST, E., 1979: Zur Temperaturabhängigkeit des Mitochondrienstoffwechsels bei *Helix pomatia* und *Helix aspersa*. Diss. phil. Wien.

KANUGO, M. S., u. PROSSER, C. L., 1959: Physiological and biochemical adaption of goldfish to cold and warm temperatures. II: Oxygen consumption of liver homogenate; Oxygen consumption and oxidative phosphorylation of liver mitochondria. J. Cellular Comp. Physiol. 54: 265–274.

KERKUT, G. A., u. LAVERACK, M. S., 1957: The respiration of *Helix pomatia*, a balance sheet. J. exp. Biol. 34: 97–105.

KIRBERGER, C., 1953: Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit von Lebensprozessen bei verschiedenen Wirbellosen. Z. vergl. Physiol. 35: 175–198.

KRATOCHWIL, H., 1976: Langfristige Messungen des Sauerstoffverbrauches und der Herzschlagrate an trockenschlafenden Landpulmonaten. Zool. Anz. 196: 289–317

KÜNNEMANN, H., LAUDIEN, H., u. PRECHT, H., 1970: Der Einfluß von Temperaturänderungen auf Enzyme der Fischmuskulatur. Mar. Biol. 7: 71–81.

LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., u. RANDALL, R. J., 1951: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.

MACMAHON, R. F., u. RUSSELL-HUNTER, W. D., 1977: Temperature relations of aerial and aquatic respiration in six littoral snails in relation to their vertical zonation. Biol. Bull. 152: 182–198.

MEINCKE, K. F., 1972: Osmotischer Druck und ionale Zusammensetzung der Hämolymphe winterschlafender *Helix pomatia* bei konstanter und sich zyklisch ändernder Temperatur. Z. vergl. Physiol. 76: 226–232.

MEINCKE, K. F., 1975: The chemical ingredients of hemolymph and some selected organs of *Helix pomatia* in constant ambient conditions in the course of the year. Comp. Biochem. Physiol. 52 A: 135–140.

MEWS, H., 1957: Über die Temperaturadaptation der Sekretion von Verdauungsfermenten und deren Hitzeresistenz. Z. vergl. Physiol. 40: 345–355.

MURRAY, C. N., u. RILEY, J. P., 1969: The solubility of gases in distilled water and sea water. – II. Oxygen. Deep-Sea Res. 16: 311–320.

NEWELL, R. C., 1967: Oxidative activity of poikilotherm mitochondria as a function of temperature. J. Zool. London 151: 299–311.

NEWELL, R. C., u. PYE, V. I., 1971a: Quantitative aspects of the relationship between metabolism and temperature in the winkle *Littorina littorea* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 38 B: 635–650.

NEWELL, R. C., u. PYE, V. I., 1971b: Temperature-induced variations in the respiration of mitochondria from the winkle, *Littorina littorea* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 40 B: 249–261.

NOPP, H., 1971a: Einige Wirkungen der Amputation optischer Tentakel bei einer Landlungenschnecke (*Eobania vermiculata*, Müller; Helicidae). Experientia 27: 855.

NOPP, H., 1971b: Dikontinuität von Stoffwechsel, Atmung und Kreislauf bei trochenschlafenden Heliciden. Sbr. öst. Akad. Wiss. 179: 1–13.

NOPP, H., 1974: Physiologische Aspekte des Trockenschlafes der Landschnekken. Sbr. öst. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 182, Bd. I: 2–75.

NOPP, H., u. FARAHAT, A., 1967: Temperatur und Zellstoffwechsel bei Heliciden. Z. vergl. Physiol. 55: 103–118.

PIETRZYKOWSI, A., u. MICHEJDA, J. W., 1969: Studies on apparent inability of snail hepatopankreas mitochondria for oxidative phosphorylation. Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznan (Ser D) 9: 193–203.

PILC, L., u. OBUCHOWICZ, L., 1976: Uncoupling effect of endogenous calcium on oxidative phosphorylation in hepatopankreas mitochondria of *Viviparus viviparus* L. during their isolation. Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznan (Ser D) 16: 135–143.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

PRECHT, H., 1961: Temperaturanpassungen bei wechselwarmen Tieren. Zool. Anz. Suppl. 24: 38–60.

PRECHT, H., CHRISTOPHERSEN, J., HENSEL, H., u. LARCHER, W., 1973: Temperature and Life. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg.

PYE, V I., WIESER, W., u. ZECH, M., 1976: The effect of season and experimental temperature on the rates of oxidative phosphorylation of liver and muscle mitochondria from the tench *(Tinca tinca).* Comp. Biochem. Physiol. 54 B: 13–20.

REES, K. R., 1953: Aerobic metabolism of the hepatopancreas of *Helix pomatia.* Biochem. J. 55: 478–484.

RIDDLE, W. A., 1977: Comparative respiratory physiology of a desert snail, *Rabdotus schiedeanus,* and a garden snail, *Helix aspersa.* Comp. Biochem. Physiol. 56 A: 369–373.

SMITH, C., 1973: The temperature dependence of oxidative phosphorylation and the activity of various enzyme systems in liver mitochondria from cold- and warm-blooded animals. Comp. Biochem. Physiol. 46 B: 445–461.

SMITH, H., VAN DEN BERG, R. J., u. KIJNE-DAN HARTOG, I., 1974: Some experiments on thermal acclimation in the goldfish *(Carassius auratus).* Netherl. J. Zool. 24: 32–49.

TILGNER-PETER, A., 1957: Jahreszeitliche und klimatische Schwankungen im Calcium- und Phosphatgehalt des Blutes von *Helix pomatia.* Zool. Jb. Abt. allg. Zool. u. Physiol. 67: 365–372.

WIDDOWS, J., BAYNE, B. L., LIVINGSTONE, D. R., NEWELL, R. I., u. DONKIN, P., 1979: Physiological and biochemical response of bivalve molluscs to exposure to air. Comp. Biochem. Physiol. 62 A: 301–308.

WIESER, W., 1978: The initial stage of anaerobic metabolism in the snail, *Helix pomatia* L. Febs Letters 95: 375–378.

WIESER, W., 1980: Responses of *Helix pomatia* to anoxia. Changes of solute activity and other properties of the hemolymph. J. Comp. Physiol. (im Druck).

WODTKE, E., 1974: Eigenschaften von isolierten Mitochondrien des Aales und ihre Abhängigkeit von der Adaptationstemperatur unter besonderer Berücksichtigung der oxidativen Phosphorylierung. J. Comp. Physiol. 91: 277–307.